

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

30.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年 1 1 月 2 6 日  
Date of Application:

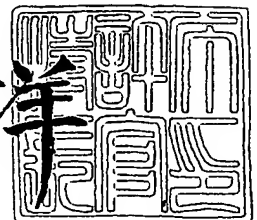
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 3 9 6 2 7 8  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 3 9 6 2 7 8 ]

出 願 人                      第一製薬株式会社  
Applicant(s):                      セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

2 0 0 5 年   1 月 1 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 NP03-1161  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61P 29/00  
C12N 09/50  
C12Q 01/37

【発明者】  
【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地  
幕張テクノガーデンD棟 1 7 階  
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内  
【氏名】 土居 洋文

【発明者】  
【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地  
幕張テクノガーデンD棟 1 7 階  
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内  
【氏名】 榊田 彰一

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 6 番 1 3 号  
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内  
【氏名】 井角 能隆

【特許出願人】  
【識別番号】 000002831  
【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【特許出願人】  
【識別番号】 500520628  
【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100088904  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 庄司 隆  
【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 067070  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

以下の群より選ばれる阻害方法；

(i) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害すること  
を特徴とするプロカスパーゼ1の多量体化阻害方法、

(ii) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害するこ  
とを特徴とするプロカスパーゼ1の活性化阻害方法、

および

(iii) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する  
ことを特徴とするカスパーゼ1 (caspase-1) の生成阻害方法。

**【請求項 2】**

NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害することを特徴  
とする炎症性疾患の防止方法および／または治療方法。

**【請求項 3】**

NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する化合物を少  
なくとも1つ用いることを特徴とする炎症性疾患の防止方法および／または治療方法。

**【請求項 4】**

炎症性疾患が、敗血症、炎症性腸疾患、クローン病またはリウマチである請求項2または  
3に記載の防止方法および／または治療方法。

**【請求項 5】**

NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する化合物の同  
定方法であって、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を可能にする条件下、NOD2およ  
び／またはプロカスパーゼ1を化合物と接触させ、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を  
検出することができるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグ  
ナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在および／または変化を検出すること  
により、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害するか否かを決定する方法。

**【請求項 6】**

以下の群より選ばれる阻害剤；

(i) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害すること  
を特徴とするプロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、

(ii) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害するこ  
とを特徴とするプロカスパーゼ1の活性化阻害剤、

および

(iii) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する  
ことを特徴とするカスパーゼ1 (caspase-1) の生成阻害剤。

**【請求項 7】**

以下の群より選ばれる阻害剤；

(i) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する化合  
物を少なくとも1つ含有するプロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、

(ii) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する化  
合物を少なくとも1つ含有するプロカスパーゼ1の活性化阻害剤、

および

(iii) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する  
化合物を少なくとも1つ含有するカスパーゼ1 (caspase-1) の生成阻害剤。

**【請求項 8】**

NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害することを特徴  
とする炎症性疾患の防止剤および／または治療剤。

**【請求項 9】**

NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する化合物を少  
なくとも1つ含有する炎症性疾患の防止剤および／または治療剤。

**【請求項 10】**

請求項 6 または 7 に記載の阻害剤を含有する炎症性疾患の防止剤および／または治療剤。

**【請求項 11】**

炎症性疾患が、敗血症、炎症性腸疾患、クローン病またはリウマチである請求項 8 から 10 のいずれか 1 項に記載の防止剤および／または治療剤。

**【請求項 12】**

請求項 5 に記載の同定方法に用いることを特徴とする試薬キットであって、NOD2、NOD2 をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか 1 つと、プロカスパーゼ 1 (procaspase-1)、プロカスパーゼ 1 をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか 1 つとを含んでなる試薬キット。

## 【書類名】明細書

## 【発明の名称】プロカスパーゼ1活性化阻害剤

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーゼ1の多量体化阻害方法、プロカスパーゼ1の活性化阻害方法およびカスパーゼ1 (caspase-1) の生成阻害方法に関する。また、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害することを特徴とする炎症性疾患の防止方法および/または治療方法に関する。さらに、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物の同定方法に関する。また、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、プロカスパーゼ1の活性化阻害剤およびカスパーゼ1の生成阻害剤、あるいは炎症性疾患の防止剤および/または治療剤に関する。さらに、NOD2、NOD2をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、プロカスパーゼ1、プロカスパーゼ1をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

カスパーゼ1は、インターロイキン1 $\beta$ 転換酵素 (interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme; ICE) とも呼ばれ、炎症性サイトカインであるインターロイキン1 (以下、IL-1 $\beta$ と略称する) やインターロイキン18 (以下、IL-18と略称する) をその前駆体から成熟型へと変換するシステインプロテアーゼである (非特許文献1-4)。カスパーゼ1遺伝子は炎症性刺激、例えばリポポリサッカライド (以下、LPSと略称する) で誘導され、カスパーゼ1活性も同様の刺激で増加する (非特許文献4-6)。また、種々の炎症性疾患、例えば、敗血症、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease)、リウマチ等において、カスパーゼ1活性の促進が報告されている。

## 【0003】

カスパーゼ1は、カスパーゼ1前駆体として発現するプロカスパーゼ1が多量体化を起こし、それに伴う自己切断により生成されると考えられている。この過程において、プロカスパーゼ1の多量体化は、RIP2またはNOD1がプロカスパーゼ1と結合することで誘導されることが報告されている (非特許文献7および8)。

## 【0004】

以下に本明細書において引用した文献を列記する。

【特許文献1】国際公開第WO01/67299号パンフレット。

【非特許文献1】「ネイチャー (Nature)」、1992年、第356巻、p. 768-774。

【非特許文献2】「サイエンス (Science)」、1992年、第256巻、p. 97-100。

【非特許文献3】「ネイチャー」、1997年、第386巻、p. 619-623。

【非特許文献4】「サイエンス」、1997年、第275巻、p. 206-209。

【非特許文献5】「ネイチャー」、1994年、第370巻、p. 270-275。

【非特許文献6】「ブラッド (Blood)」、1998年、第91巻、p. 577-584。

【非特許文献7】「カレント バイオロジー (Current Biology)」、1998年、第8巻、p. 885-888。

【非特許文献8】「バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ (Biochemical and Biophysical Research Communications)」、2002年、第299巻、p.

652-658。

【非特許文献9】「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、2002年、第277巻、p. 41701-41705。

【非特許文献10】「ガット (Gut)」、2003年、第52巻、p. 840-846。

【非特許文献11】「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー」、2001年、第276巻、p. 4812-4818。

【非特許文献12】ウルマー (K. M. Ulmer)、*「サイエンス (Science)」*、1983年、第219巻、p. 666-671。

【非特許文献13】「ペプチド合成」、丸善株式会社、1975年。

【非特許文献14】「ペプチド シンテシス (Peptide Synthesis)」、インターサイエンス (Interscience)、ニューヨーク (New York)、1996年。

【非特許文献15】「セル (Cell)」、1995年、第80巻、p. 401-411。

【非特許文献16】「サイエンス」、1995年、第267巻、p. 2000-2003。

【非特許文献17】「プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ (Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America)」、2001年、第98巻、p13249-13254。

【非特許文献18】「ネイチャー」、2003年、第423巻、p. 356-361。

【非特許文献19】「バイオケミカル ファーマコロジー (Biochemical Pharmacology)」、2002年、第64巻、p. 1-8。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【0005】

本発明の課題は、プロカスパーゼ1と結合してこれの多量体化を促進し、これを活性化する新たな蛋白質を見出し、該蛋白質とプロカスパーゼ1の結合を阻害することにより、プロカスパーゼ1の多量体化阻害、プロカスパーゼ1の活性化阻害およびカスパーゼ1の生成阻害、ひいては炎症性疾患の防止および／または治療を可能にする手段を提供することである。

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0006】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、プロカスパーゼ1がNOD2と相互作用することをインシリコ (in silico) で予測し、そしてNOD2とプロカスパーゼ1が結合することにより、プロカスパーゼ1の多量体化が促進され、その結果プロカスパーゼ1からカスパーゼ1への活性化およびカスパーゼ1の生成が引き起こされることを実験的に証明して本発明を完成した。

##### 【0007】

すなわち、本発明は、

1. 以下の群より選ばれる阻害方法；

(i) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害すること  
を特徴とするプロカスパーゼ1の多量体化阻害方法、

(ii) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害すること  
を特徴とするプロカスパーゼ1の活性化阻害方法、

および

- (i i i) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害することを特徴とするカスパーゼ1 (caspase-1) の生成阻害方法、
2. NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害することを特徴とする炎症性疾患の防止方法および/または治療方法、
3. NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ用いることを特徴とする炎症性疾患の防止方法および/または治療方法、
4. 炎症性疾患が、敗血症、炎症性腸疾患、クローン病またはリウマチである前記2. または3. の防止方法および/または治療方法、
5. NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する化合物の同定方法であって、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を可能にする条件下、NOD2および/またはプロカスパーゼ1を化合物と接触させ、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を検出することができるシグナルおよび/またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび/またはマーカーの存在若しくは不存在および/または変化を検出することにより、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害するか否かを決定する方法、
6. 以下の群より選ばれる阻害剤；
- (i) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、
- (i i) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害することを特徴とするプロカスパーゼ1の活性化阻害剤、
- および
- (i i i) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害することを特徴とするカスパーゼ1 (caspase-1) の生成阻害剤、
7. 以下の群より選ばれる阻害剤；
- (i) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含有するプロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、
- (i i) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含有するプロカスパーゼ1の活性化阻害剤、
- および
- (i i i) NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含有するカスパーゼ1 (caspase-1) の生成阻害剤、
8. NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害することを特徴とする炎症性疾患の防止剤および/または治療剤、
9. NOD2とプロカスパーゼ1 (procaspase-1) の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含有する炎症性疾患の防止剤および/または治療剤、
10. 前記6. または7. の阻害剤を含有する炎症性疾患の防止剤および/または治療剤、
11. 炎症性疾患が、敗血症、炎症性腸疾患、クローン病またはリウマチである前記8. から10. のいずれかの防止剤および/または治療剤、
12. 前記5. の同定方法に用いることを特徴とする試薬キットであって、NOD2、NOD2をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、プロカスパーゼ1 (procaspase-1)、プロカスパーゼ1をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キット、
- に関する。

**【発明の効果】****【0008】**

本発明ではNOD2がプロカスパーゼ1と結合することを見出した。すなわち、NOD2とプロカスパーゼ1が結合することにより、プロカスパーゼ1の多量体化が促進され、

その結果プロカスパーゼ 1 からカスパーゼ 1 への活性化およびカスパーゼ 1 の生成が引き起こされることを初めて明らかにした。カスパーゼ 1 は炎症性反応に関与する因子であり、炎症性疾患においてその活性の促進が報告されている。これらから、NOD 2 とプロカスパーゼ 1 の結合を阻害することを特徴とする本発明は、炎症性疾患の防止および／または治療のために非常に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明について発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。

本明細書においては単離された若しくは合成の完全長蛋白質；単離された若しくは合成の完全長ポリペプチド；または単離された若しくは合成の完全長オリゴペプチドを意味する総称的用語として「ポリペプチド」という用語を使用することがある。ここで蛋白質、ポリペプチド若しくはオリゴペプチドはペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している 2 個以上のアミノ酸を含むものである。以降、アミノ酸を表記する場合、1 文字または 3 文字にて表記することがある。

【0010】

本発明においては、NOD 2 がプロカスパーゼ 1 と相互作用することを、国際公開 WO 01/67299 号パンフレット記載の方法に従ってインシリコで予測した。そして実験的に、NOD 2 がプロカスパーゼ 1 と結合することを明らかにした。さらに、NOD 2 とプロカスパーゼ 1 が結合することにより、プロカスパーゼ 1 の多量体化が促進され、その結果プロカスパーゼ 1 からカスパーゼ 1 への活性化およびカスパーゼ 1 の生成が引き起こされ、細胞内で IL-1 $\beta$  前駆体 (pro IL-1 $\beta$ ) のカスパーゼ依存的な切断が誘導されて成熟型 IL-1 $\beta$  の分泌が促進されることを初めて明らかにした。

【0011】

NOD 2 は、CARD 15 と呼ばれ、単球（非特許文献 9）、好中球（非特許文献 9）、白血球（非特許文献 9）、顆粒球（非特許文献 9）、樹状細胞（非特許文献 9）、腸上皮細胞（非特許文献 9 および 10）、およびマクロファージ（非特許文献 10）で発現していること、急性前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 や正常大腸細胞株 FHC では LP S や腫瘍壊死因子  $\alpha$ （以下、TNF- $\alpha$  と略称する）等の炎症刺激で NOD 2 遺伝子が増加することが報告されている（非特許文献 9）。NOD 2 の機能としては、NOD 2 遺伝子を HL-60 細胞に一過性発現させることにより NF- $\kappa$ B が活性化されることが報告されている（非特許文献 11）。しかしながら、NOD 2 がプロカスパーゼ 1 と結合して機能するという報告はない。

【0012】

これらから、NOD 2 とプロカスパーゼ 1 の結合を阻害することにより、プロカスパーゼ 1 の多量体化、プロカスパーゼ 1 の活性化およびカスパーゼ 1 の生成を阻害でき、その結果、カスパーゼ 1 の増加により発症・進展する炎症性疾患の防止および／または治療が可能になる。

【0013】

これら知見に基づいて、本発明においては、NOD 2 とプロカスパーゼ 1 の結合を阻害することを特徴とする、プロカスパーゼ 1 の多量体化阻害方法、プロカスパーゼ 1 の活性化阻害方法およびカスパーゼ 1 の生成阻害方法、並びにカスパーゼ 1 の増加に基づく疾患、具体的には炎症性疾患の防止方法および／または治療方法を提供する。

【0014】

NOD 2 遺伝子および該遺伝子がコードするポリペプチドは、それぞれ配列表の配列番号 1 および配列番号 2 に記載の各配列からなる。プロカスパーゼ 1 遺伝子および該遺伝子がコードするポリペプチドは、それぞれ配列表の配列番号 3 および配列番号 4 に記載の各配列からなる。NOD 2、プロカスパーゼ 1 およびこれらの遺伝子は上記各配列からなるものに限らず、一般に知られている NOD 2 およびプロカスパーゼ 1 の機能を有する限りにおいて、上記各配列において 1 乃至数個の変異を有するポリペプチドおよびポリヌクレオチドであることができる。また、これらの機能を促進するあるいは欠失させるといった



所望の目的のために、上記各配列に1乃至数個の変異を導入した変異体であることもできる。

#### 【0015】

「NOD2とプロカスパーゼ1の結合」とは、NOD2とプロカスパーゼ1が複合体を形成するように、水素結合、疎水結合および静電的相互作用等の非共有結合により、NOD2とプロカスパーゼ1が相互作用することを意味する。ここでの結合とは、NOD2とプロカスパーゼ1がそれら分子の一部分において結合すれば足りる。例えば、NOD2またはプロカスパーゼ1を構成するアミノ酸の中に、NOD2とプロカスパーゼ1の結合に関与しないアミノ酸が含まれていてもよい。

#### 【0016】

NOD2とプロカスパーゼ1の結合は、免疫沈降物による共沈物の確認、ツーハイブリッド法、ウエスタンブロット法および蛍光共鳴エネルギー転移法等の自体公知の方法またはこれらの方法を組合わせることにより検出され得る。

#### 【0017】

例えば、実施例2に示すように、C末にmyc-His-tagが付加されたNOD2とN末にFLAG-tagが付加されたプロカスパーゼ1との結合を、両ポリペプチドの共存下において、抗myc抗体または抗FLAG-M2抗体を用いて免疫沈降した共沈物を抗FLAG-M2抗体または抗myc抗体を用いてウエスタンブロッティングすることにより検出され得る。

#### 【0018】

「プロカスパーゼ1の多量体化」とは、プロカスパーゼ1同士が結合し、該結合により複合体を形成することを意味する。多量体化は、NOD2とプロカスパーゼ1とが結合することにより促進される。また、プロカスパーゼ1が有するカスパーゼリクルートメントドメイン(Caspase recruitment domain; CARD)が、多量体化に重要な役割を果たしていることが知られている。該複合体を構成するプロカスパーゼ1の分子数は特に制限されず、プロカスパーゼ1が自己を切断し、その結果、カスパーゼ1が生成される程度に、プロカスパーゼ1同士が結合し、複合体を形成すればよい。

#### 【0019】

「プロカスパーゼ1の活性化」とは、プロカスパーゼ1の多量体化に伴い、プロカスパーゼ1が自己切断され、カスパーゼ1が生成されることを意味する。NOD2とプロカスパーゼ1とが結合することによりプロカスパーゼ1の多量体化が促進され、それに伴う自己切断が起こり、その結果、カスパーゼ1が生成される。

#### 【0020】

「カスパーゼ1の生成」とは、プロカスパーゼ1が活性化された結果、カスパーゼ1が生成されることを意味する。

#### 【0021】

プロカスパーゼ1の多量体化阻害、プロカスパーゼ1の活性化阻害およびカスパーゼ1の生成阻害は、例えば、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物を用いることにより実施できる。ここでは、このような阻害効果を有する化合物（後述する例として競合阻害効果を有するポリペプチド類、抗体および低分子化合物等が挙げられる）を阻害剤と称する。

#### 【0022】

NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物として、好ましくは当該結合を特異的に阻害する化合物、より好ましくは当該結合を特異的に阻害する低分子量化合物が挙げられる。NOD2とプロカスパーゼ1の結合を特異的に阻害するとは、当該結合を強く阻害するが、他の蛋白質間結合は阻害しないか、弱く阻害することを意味する。

#### 【0023】

NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物として、例えば、NOD2とプロカスパーゼ1が結合する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドが例示できる。かかるポリペプチドは、蛋白質間の結合を競合的に阻害し、ひいてはプロカスパーゼ1の多量体

化およびプロカスパーゼ1の自己切断を阻害することができる。かかるポリペプチドは、NOD2またはプロカスパーゼ1のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法により合成したものから、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害するものを選択することにより得ることができる。このように特定されたポリペプチドに、1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入したものも本発明の範囲に包含される。このような変異を導入したポリペプチドは、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害するものが好ましい。変異を有するポリペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマー (Ulmer) の技術 (非特許文献12) を利用できる。このような変異の導入において、当該ポリペプチドの基本的な性質 (物性、機能または免疫学的活性等) を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸 (極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等) の間での相互の置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるポリペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を、例えばアミド化修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

#### 【0024】

上記ポリペプチドは、ペプチド化学において知られる一般的な方法で製造できる。例えば、成書 (非特許文献13および14) に記載の方法が例示されるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。具体的には、通常の液相法および固相法によるペプチド合成法、例えばFmoc法等を挙げることができる。または市販のアミノ酸合成装置を用いて製造可能である。あるいは遺伝子工学的手法により取得することもできる。例えば目的とするポリペプチドをコードする遺伝子を宿主細胞中で発現できる組換えDNA (発現ベクター) を作成し、これを適当な宿主細胞、例えば大腸菌にトランスフェクションして形質転換した後に該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から目的とするポリペプチドを回収することにより製造可能である。

#### 【0025】

NOD2とプロカスパーゼ1の結合の阻害は、NOD2またはプロカスパーゼ1を認識する抗体であって、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する抗体を用いることによっても実施可能である。かかる抗体は、NOD2またはプロカスパーゼ1自体、またはこれらの断片ポリペプチド、好ましくはNOD2とプロカスパーゼ1が結合する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により得ることができる。

#### 【0026】

NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して当該化合物の同定方法を構築し、これを使用して取得可能である。例えば、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を可能にする条件を選択し、当該条件下で、調べようとする化合物 (被検化合物) とNOD2および/またはプロカスパーゼ1とを接触させ、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を検出することができるシグナルおよび/またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび/またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物を同定できる。例えばNOD2とプロカスパーゼ1の結合により生じるシグナルまたは該結合のマーカーが、被検化合物をNOD2および/またはプロカスパーゼ1と接触させたときに消失する、あるいは低減する等の変化を示した場合、当該被検化合物はNOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害するものであると判定できる。かかる同定方法において、被検化合物をNOD2および/またはプロカスパーゼ1と予め接触させ、その後NOD2とプロカスパーゼ1を結合させることも可能であり、または被検化合物をこれらの結合の過程に共存させることも可能である。NOD2とプロカスパーゼ1の結合を可能にする条件は、インビトロのものであってよく、インビボのものであってもよい。例えば、NOD2とプロカスパーゼ1とを共発現させた細胞を用いることもできる。細胞における共発現は、NOD2をコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとプロカ

スパーゼ1をコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとを用いて慣用の遺伝子工学的方法でこれらを細胞にトランスフェクションすることにより達成できる。ここでシグナルとは、そのものの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとしてはルシフェラーゼや放射性同位体等、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等、または検出用のエピトープタグ、例えば6×His-tag等、公知のものが利用できる。これらシグナルまたはマーカーの検出方法は当業者には周知のものである。NOD2とプロカスパーゼ1の結合は、簡便には、これら蛋白質の存在若しくは不存在の検出および/またはその量の変化の測定により判定可能である。蛋白質の検出あるいは蛋白質量の定量は、自体公知の蛋白質またはペプチドの検出方法、例えばウェスタンブロッティング法等を用いて実施できる。

#### 【0027】

具体的には、例えばNOD2またはプロカスパーゼ1の一方を固相化し、他方をシグナルで標識化して用いて結合反応を行い、標識シグナルを定量的に測定するといった当業者に知られた一般的なインビトロ (in vitro) における結合実験系に、被検化合物を加えて評価することにより、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物を得ることができる。

#### 【0028】

あるいは、実施例2に示したように、NOD2遺伝子およびプロカスパーゼ1遺伝子を共発現させた細胞を用いて細胞内における結合反応を検出する試験系に、被検化合物を作用させ、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を免疫沈降法やウェスタンブロッティング等の公知方法で検出することによって、インビボ (in vivo) においてNOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害する化合物を得ることができる。

#### 【0029】

また、公知のツーハイブリッド (two-hybrid) 法を用いることも可能である。例えば、NOD2とDNA結合蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、プロカスパーゼ1と転写活性化蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、および適切なプロモーター遺伝子に接続したlacZ等レポーター遺伝子を含むプラスミドを酵母、真核細胞等に導入し、被検化合物を共存させた場合のレポーター遺伝子の発現量を被検化合物非存在下でのレポーター遺伝子の発現量とを比較することにより達成できる。被検化合物を共存させた場合のレポーター遺伝子の発現量が被検化合物非存在下でのレポーター遺伝子の発現量と比較して減少した場合には、該被検化合物にはNOD2とプロカスパーゼ1との結合を阻害する作用があると判定できる。

#### 【0030】

ビアコアシステム (BIACORE system) 等の表面プラズモン共鳴センサー、シンチレーションプロキシミティアッセイ法 (Scintillation proximity assay, SPA)、あるいは蛍光共鳴エネルギー転移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) を応用した方法を用いて、NOD2とプロカスパーゼ1との結合を阻害する化合物を同定することも可能である。

#### 【0031】

また、NOD2によるプロカスパーゼ1の多量体化を可能にする条件を選択し、該条件下でNOD2および/またはプロカスパーゼ1と被検化合物を接触させ、次いで、NOD2によるプロカスパーゼ1の多量体化を検出することのできるシグナルおよび/またはマーカーを使用する系を導入し、このシグナルおよび/またはマーカーの存在、不存在、またはその変化を検出することにより、NOD2によるプロカスパーゼ1の多量体化を阻害する化合物を同定可能である。例えば、実施例3に示したように、NOD2遺伝子またはプロカスパーゼ1遺伝子を共発現させた細胞を用いて細胞内におけるカスパーゼ1の多量体化を測定する実験系を用いて、NOD2によるプロカスパーゼ1の多量体化を阻害する

化合物を同定可能である。

#### 【0032】

また、NOD2によるプロカスパーゼ1の活性化を可能にする条件を選択し、該条件下でNOD2および／またはプロカスパーゼ1と被検化合物を接触させ、次いで、NOD2によるプロカスパーゼ1の活性化を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を導入し、このシグナルおよび／またはマーカーの存在、不存在、またはその変化を検出することにより、NOD2によるプロカスパーゼ1の活性化を阻害する化合物を同定可能である。例えば、実施例4に示したように、NOD2遺伝子およびプロカスパーゼ1遺伝子が共発現するIL-1 $\beta$ 安定発現細胞外に分泌されるIL-1 $\beta$ 量を低減させる、または消滅させる化合物を選択することにより、NOD2によるプロカスパーゼ1の活性化を阻害する化合物を同定可能である。NOD2によるプロカスパーゼ1の活性化を阻害することにより、プロカスパーゼ1の自己切断によるカスパーゼ1の生成が阻害されるため、該化合物はカスパーゼ1の生成を阻害する化合物としても用い得る。

#### 【0033】

NOD2およびプロカスパーゼ1は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、NOD2とプロカスパーゼ1の結合、およびこれら蛋白質の機能、さらにプロカスパーゼ1からその活性化により生成されるカスパーゼ1の性質等に影響がなければ、N末側やC末側に別の蛋白質やポリペプチド、例えば $\beta$ -ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tag、またはXpress-tag等のtagペプチド類を、直接的にまたはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的手法等を用いて付加したものであってもよい。

#### 【0034】

NOD2とプロカスパーゼ1の結合またはNOD2によるプロカスパーゼ1の多量体化を阻害する化合物の同定においては、該結合によるプロカスパーゼ1の多量体化に伴うプロカスパーゼ1の自己切断により、該結合または該多量体化の検出が困難になる場合がある。かかる場合は、結合または多量体化を容易に検出するために、NOD2と結合して多量体化するが自己切断されないプロカスパーゼ1変異体、例えばそのアミノ酸配列285番目のシステインをアラニンに置換した変異体を作製して用いることもできる。

#### 【0035】

被検化合物としては、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、またはNOD2またはプロカスパーゼ1の一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等が挙げられる。あるいは、NOD2とプロカスパーゼ1の結合部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドの構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等も被検化合物として好適である。

#### 【0036】

上記同定方法で得られた化合物は、プロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、プロカスパーゼ1の活性化阻害剤およびカスパーゼ1の生成阻害剤として利用可能である。当該化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより、医薬組成物として調製可能である。医薬組成物の調製において、これら化合物は、単独で使用することもできるし、複数を組み合わせて使用することも可能である。

#### 【0037】

上記化合物および上記阻害剤はさらに、カスパーゼ1の作用やその増加に基づく疾患の防止剤および／または治療剤、並びに当該疾患の防止方法および／または治療方法に利用可能である。かかる疾患としては、例えば敗血症、炎症性腸疾患、クローン病およびリウマチ等を挙げることができる。

#### 【0038】

敗血症は、細菌や毒素（エンドトキシンやエキソトキシン等）等の刺激によって遊離された炎症性サイトカインによって惹起される生体の過剰な反応、すなわち感染に起因した

全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome) である。カスパーゼ1遺伝子欠損マウスでは、エンドトキシンショックに対する抵抗性が増すことが報告されている (非特許文献15)。また、カスパーゼ1遺伝子欠損マウスから調製されたマクロファージや単球で、LPSで誘導されるIL-1 $\beta$ およびIL-18の産生がほぼ完全に抑制されることが報告されている (非特許文献4、15および16)。これらから、カスパーゼ1の活性を阻害することにより、マクロファージや単球から分泌されるIL-1 $\beta$ およびIL-18の産生増加を介して起こるエンドトキシンショックを抑制し得ると考えられる。一方、NOD2遺伝子も単球やマクロファージで発現が確認されている (非特許文献9および10)。したがって、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害し、ひいてはプロカスパーゼ1の多量体化阻害、プロカスパーゼ1の活性化阻害およびカスパーゼ1の生成阻害により敗血症の防止および/または治療が可能になると考える。

#### 【0039】

炎症性腸疾患は、多くは慢性に経過し、難治性の種々の病因 (クローン病等) によって生じる大腸や小腸の炎症性疾患を指す。正常マウスにデキストラン硫酸 (以下、DSSと略称する) を慢性投与した場合には大腸炎を発症するが、カスパーゼ1遺伝子欠損マウスにDSSを慢性投与した場合には大腸炎を発症しないこと、DSS投与したカスパーゼ1遺伝子欠損マウスから調製した大腸組織培養のIL-1 $\beta$ およびIL-18分泌量は、DSS投与した正常マウスに比して有意に減少していることが報告されている (非特許文献17)。これらの結果は、大腸炎の発症・進展にカスパーゼ1活性の増加とそれに伴うIL-1 $\beta$ およびIL-18分泌の増加が重要である可能性を示すものである。一方、NOD2遺伝子も腸上皮細胞やマクロファージで発現が確認されている (非特許文献10)。したがって、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害し、ひいてはプロカスパーゼ1の多量体化阻害、プロカスパーゼ1の活性化阻害およびカスパーゼ1の生成阻害により炎症性腸疾患の防止および/または治療が可能になると考える。

#### 【0040】

リウマチは、関節の滑膜に存在するマクロファージから分泌されるサイトカインによって進行し、IL-1 $\beta$ やIL-18もリウマチの進行に寄与していることが報告されている (非特許文献18)。また、コラーゲンで誘導される関節炎モデルマウスにカスパーゼ1阻害剤を投与すると炎症が抑制されることが報告されている (非特許文献19)。これらの事実は、滑膜のマクロファージにおけるカスパーゼ1活性の増加とそれに伴うIL-1 $\beta$ およびIL-18分泌の増加がリウマチの進行に寄与している可能性を示すものである。実際、リウマチ治療薬としてカスパーゼ1阻害剤 (Pralnacasan、Vertex社) が臨床試験第2相の進行中である。NOD2が滑膜に存在するマクロファージに発現しているという報告はない。しかしながら、大腸に存在するマクロファージに発現しているという報告がある (非特許文献10)。したがって、NOD2とプロカスパーゼ1の結合を阻害し、ひいてはプロカスパーゼ1の多量体化阻害、プロカスパーゼ1の活性化阻害およびカスパーゼ1の生成阻害によりリウマチの防止および/または治療が可能になると考える。

#### 【0041】

本発明に係る疾患の防止剤および/または治療剤は、上記化合物、上記プロカスパーゼ1の多量体化阻害剤、上記プロカスパーゼ1の活性化阻害剤および上記カスパーゼ1の生成阻害剤のうち少なくともいずれか1つを有効成分としてその有効量含む医薬となしてもよいが、通常は、1種または2種以上の医薬用担体を用いて医薬組成物として製造することが好ましい。

#### 【0042】

本発明に係る医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択されるが、通常約0.00001~70重量%、好ましくは0.0001~5重量%程度の範囲とするのが適当である。

#### 【0043】

医薬用担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤や賦形剤等を例示でき、これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択使用される。

【0044】

例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等が挙げられる。これらは、本発明に係る剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組合せて使用される。

【0045】

所望により、通常の蛋白質製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤等を適宜使用して調製することもできる。

【0046】

安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等を例示でき、これらは単独でまたは界面活性剤等と組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等およびそれらの誘導体等のいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよい。界面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等が包含される。

【0047】

緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、ε-アミノカプロン酸、グルタミン酸および/またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）等を例示できる。

【0048】

等張化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等を例示できる。

【0049】

キレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸等を例示できる。

【0050】

本発明に係る医薬および医薬組成物は、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。

【0051】

医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無等）、および担当医師の判断等に応じて適宜選択される。一般的には適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり約0.01μg乃至100mg程度、好ましくは約0.1μg～1mg程度の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のた



めの一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。上記投与量は 1 日 1 ～数回に分けて投与することができ、数日または数週間に 1 回の割合で間欠的に投与してもよい。

#### 【0052】

本発明の医薬組成物を投与するときには、該医薬組成物を単独で使用してもよく、あるいは目的の疾患の防止および／または治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。

#### 【0053】

投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。例えば、非経口経路として、通常の静脈内投与、動脈内投与の他、皮下、皮内、筋肉内等への投与を挙げることができる。あるいは経口による投与も可能である。さらに、経粘膜投与または経皮投与も可能である。

#### 【0054】

投与形態としては、各種の形態が目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤等の固体投与形態や、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、懸濁剤、脂肪乳剤、リポソーム製剤、シクロデキストリン等の包接体、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤（点滴剤、注射剤）、経鼻剤、吸入剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形、調製することができる。

#### 【0055】

さらに本発明は、NOD 2、NOD 2 をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、および該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか 1 つと、プロカスパーゼ 1、プロカスパーゼ 1 をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、および該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか 1 つとを含んでなるキットを提供する。当該キットは、例えば本発明に係る同定方法に使用できる。

#### 【0056】

ポリヌクレオチドは、例えばヒト cDNA ライブラリーから自体公知の遺伝子工学的的手法により調製することができる。ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体は、当該ポリヌクレオチドを適当な発現 DNA ベクター、例えば細菌プラスミド由来のベクターに自体公知の遺伝子工学的的手法で導入することにより、また得られたベクターを周知の方法で適当な細胞にトランスフェクションすることにより得られる。

#### 【0057】

上記キットは、NOD 2 とプロカスパーゼ 1 の結合を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、緩衝液、並びに塩等、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤等の物質を含んでいてもよい。製剤化にあたっては、使用する各物質それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

#### 【0058】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

#### 【実施例 1】

#### 【0059】

（プロカスパーゼ 1 と相互作用する機能を有する蛋白質のインシリコでの探索）

プロカスパーゼ 1 と相互作用する機能を有する蛋白質を、特許文献 1 に記載の予測方法に従って予測した。すなわち、プロカスパーゼ 1 のアミノ酸配列をある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質とプロカスパーゼ 1 との間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをプロ

カスパーゼ1と相互作用すると予測した。

解析の結果、プロカスパーゼ1と相互作用する機能を有すると予測される蛋白質として、NOD2を見出した。

#### 【実施例2】

##### 【0060】

(NOD2とプロカスパーゼ1の結合解析)

NOD2とプロカスパーゼ1が結合するか否かを、インビボ バインディングアッセイにより検討した。

##### 【0061】

<材料およびその調製>

本実施例においては、プロカスパーゼ1として、プロカスパーゼ1のアミノ酸配列285番目のシステインをアラニンに変換した変異体(C285A)を用いた。プロカスパーゼ1(C285A)は、この1アミノ酸置換により、自己切断が起きない。プロカスパーゼ1(C285A)のオープンリーディングフレーム(以下、ORFと略称する)をpCMV-Tag2(STRATAGENE社)に挿入し、N末にFLAG-tagが付加されたプロカスパーゼ1(C285A)[FLAG-procaspase-1(C285A)]発現用プラスミドを得た。また、NOD2のORFをpcDNA3.1/myc-His(INVITROGEN社)に挿入し、C末にmyc-His-tagが付加されたNOD2(NOD2-myc-His)発現用プラスミドを得た。

##### 【0062】

<方法>

HEK293T細胞に、FLAG-procaspase-1(C285A)発現用プラスミドのみ、NOD2-myc-His発現用プラスミドのみ、または両方を組み合わせて、FuGene6(Roche社)を用いてトランスフェクションした。各発現用プラスミドは、それぞれ2.5μgずつ用いた。また、DNAの総量は5μgとなるようにpCMV-Tag2またはpcDNA3.1(-)/myc-Hisにて調整した。48時間培養後、0.5mlのリシスバッファー1[lysis buffer 1:50mM Tris-HCl(pH7.6)/150mM NaCl/0.1% ノニデットP-40(NP-40)]にて細胞溶解液を作製した。各細胞溶解液にマウスIgG結合アガロース(mouse IgG-conjugated agarose, Sigma社)またはウサギIgG結合アガロース(Sigma社)を添加し、4℃で1時間転倒混和した後、上清を回収した。各上清に抗FLAG M2抗体結合アガロース(Santa Cruz社)または抗myc抗体結合アガロース(Santa Cruz社)を添加し、4℃で一晩転倒混和した後、上清を除去して結合画分を回収した。結合画分をSDS-PAGEで展開後、抗myc抗体(Santa Cruz社)および抗FLAG M2抗体を用いたウエスタンブロッティングにて各蛋白質を検出した。また、各細胞溶解液についてもウエスタンブロッティングにて各蛋白質を検出した。

##### 【0063】

<結果>

図1-Aに示すように、それぞれの細胞溶解液に目的とする蛋白質が発現していることが確認できた。また、図1-Bの左図に示すように、NOD2-myc-HisとFLAG-procaspase-1(C285A)を共発現させた細胞から作製した細胞溶解液について抗FLAG M2抗体を用いて免疫沈降した結果、NOD2-myc-Hisのバンドが検出された。そのバンド強度は、NOD2-myc-Hisを単発現させて作製した細胞溶解液を免疫沈降した時に検出されたバンド強度に比して強かったことから、NOD2がプロカスパーゼ1と共沈すると考えられた。また同様に、図1-Bの右図に示すように抗myc抗体で免疫沈降した結果、NOD2-myc-HisとFLAG-procaspase-1(C285A)を共発現させた細胞溶解液でのみ、FLAG-procaspase-1(C285A)のバンドが検出されたことから、プロカスパーゼ1がNOD2と共沈すると考えられた。以上の結果から、NOD2はプロカスパーゼ1と結



合すると結論づけた。

### 【実施例 3】

#### 【0064】

(NOD2 によるプロカスパーゼ 1 の多量体化の促進の検討)

プロカスパーゼ 1 からカスパーゼ 1 への活性化は、プロカスパーゼ 1 の多量体化とそれに伴う自己切断により引き起こされると考えられている。そこで、NOD2 がプロカスパーゼ 1 の多量体化にどのような効果を示すか検討を行った

#### 【0065】

<材料およびその調製>

各発現用プラスミド

プロカスパーゼ 1 (C285A) ORF を pCMV-Tag3 (STRATAGENE 社) に挿入し、N 末に myc-tag が付加されたプロカスパーゼ 1 (C285A) [Myc-procaspase-1 (C285A)] 発現用プラスミドを得た。また、NOD2 ORF を pCMV-Tag5 (STRATAGENE 社) に挿入し、C 末に myc-tag が付加された NOD2 (NOD2-myc) 発現用プラスミドを得た。さらに、実施例 2 と同様の方法で調製した FLAG-procaspase-1 (C285A) を用いた。

#### 【0066】

<方法>

HEK293T 細胞に、FLAG-procaspase-1 (C285A) 発現用プラスミド 0.5  $\mu$ g および Myc-procaspase-1 (C285A) 発現用プラスミド 0.5  $\mu$ g と NOD2-myc 発現用プラスミド 0~1.0  $\mu$ g とを FuGene 6 (Roche 社) を用いてトランスフェクションした。DNA の総量は 2  $\mu$ g となるように pCMV-Tag5 にて調整した。24 時間培養後、0.25 ml/well のリシスバッファー 2 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5) / 150 mM NaCl / 2 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) / 0.5 % NP-40] にて細胞溶解液を作製した。各細胞溶解液 0.2 ml に抗 FLAG M2 抗体結合アガロース 15  $\mu$ l を添加し、4℃で一晩転倒混和した後、上清を除去してアガロースを回収した。リシスバッファー 2 を 0.5 ml 用いてアガロースを 2 回洗浄後、2× SDS サンプルバッファーを 15  $\mu$ l 加え、100℃で 5 分間熱処理した。SDS-PAGE で展開し、抗 myc 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、FLAG-procaspase-1 (C285A) と結合して共沈する Myc-procaspase-1 (C285A) の量を測定することでプロカスパーゼ 1 の多量体化の度合いを評価した。また、各細胞溶解液についてウエスタンブロッティングにて各蛋白質の発現量をチェックした。

#### 【0067】

<結果>

図 2-A に示すように、細胞溶解液から抗 FLAG M2 抗体により回収された試料において、NOD2-myc 発現用プラスミド量依存的に抗 myc 抗体で検出されるバンドの量が増加した。このことは、FLAG-procaspase-1 (C285A) と結合する Myc-procaspase-1 (C285A) 量が、NOD2-myc 発現用プラスミド量依存的に増加したことを意味する。また図 2-B に示すように、各発現用プラスミドをトランスフェクションした細胞のいずれにおいても、Myc-procaspase-1 (C285A) および FLAG-procaspase-1 (C285A) がほぼ同量発現していることが確認できた。これらから、NOD2 がプロカスパーゼ 1 の多量体化を促進することが明らかになった。

### 【実施例 4】

#### 【0068】

(細胞内でのカスパーゼ 1 依存的な proIL-1 $\beta$  から IL-1 $\beta$  への切断と IL-1 $\beta$  分泌に及ぼす NOD2 の効果)

proIL-1 $\beta$  安定発現細胞に、プロカスパーゼ 1 発現用プラスミドおよび／または

NOD2発現用プラスミドを導入し、NOD2存在下でプロカパーゼ1からカスパーゼ1への活性化が引き起こされ、細胞内での $\text{proIL-1}\beta$ から $\text{IL-1}\beta$ への切断および細胞外への $\text{IL-1}\beta$ 分泌量に変化が観察されるか否か検討を行った。

#### 【0069】

##### <材料およびその調製>

##### 1. 各発現プラスミドの作成

プロカパーゼ1 ORFをpCMV-Tag2に挿入し、N末にFLAG-tagが付加されたプロカパーゼ1 (FLAG-procaspase-1) 発現用プラスミドを得た。また、NOD2-myc発現用プラスミドは、実施例3と同様の方法で作製した。ProIL-1 $\beta$  ORFをpcDNA3.1/myc-Hisに挿入し、C末にmyc-Hisが付加されたproIL-1 $\beta$ 発現用プラスミドを得た。

#### 【0070】

##### 2. proIL-1 $\beta$ 安定発現細胞の作成

HEK293細胞に、proIL-1 $\beta$ 発現用プラスミドをFuGene6 (Roche社)を用いてトランスフェクションした。その後、1mg/mlのジェネティシン (geneticin) 含有培地で増殖してくるクローンを選択した。選択したクローンのうち、proIL-1 $\beta$ の発現が認められたクローンを実験に用いた〔ProIL-1 $\beta$ 安定発現細胞 (HEK293)〕。

#### 【0071】

##### <方法>

##### 1. 細胞内でのproIL-1 $\beta$ からIL-1 $\beta$ への切断に及ぼすNOD2の効果

6ウェルプレートに、IL-1 $\beta$ 安定発現細胞 (HEK293) を $5 \times 10^5$  /well播種して一晚培養後、FLAG-procaspase-1発現用プラスミド0.5 $\mu$ gおよび/またはNOD2-myc発現用プラスミド0.1~2.0 $\mu$ gをFuGene6 (Roche社)を用いてトランスフェクションした。DNAの総量は2.5 $\mu$ gとなるようにpCMV-Tag2またはpCMV-Tag5にて調整した。24時間培養後、細胞に0.25ml/wellのリシスバッファー2を加え、細胞溶解液を作製した。

#### 【0072】

各ウェルから調製した細胞溶解液40 $\mu$ lに5 $\times$  SDSサンプルバッファー10 $\mu$ lを加え、100℃で5分間熱処理した。その後、SDS-PAGEで展開し、抗myc抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、proIL-1 $\beta$ 、IL-1 $\beta$ それぞれの量およびNOD2量を測定した。また、抗FLAG抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、プロカパーゼ1量を測定した。

#### 【0073】

##### 2. カスパーゼ1依存的なIL-1 $\beta$ 分泌に及ぼすNOD2の効果

6ウェルプレートに、IL-1 $\beta$ 安定発現細胞 (HEK293) を $5 \times 10^5$  /well播種して一晚培養後、FLAG-procaspase-1発現用プラスミド0.5 $\mu$ gおよび/またはNOD2-myc発現用プラスミド0.1~1.0 $\mu$ gをFuGene6を用いてトランスフェクションした。DNAの総量は2.5 $\mu$ gとなるようにpCMV-Tag2またはpCMV-Tag5にて調整した。24時間培養後、培養上清を回収した。回収した各ウェルの培養上清を10%牛胎児血清 (FCS) 含有DMEMで2倍希釈し、human IL-1 $\beta$  ELISA kit (Bio Source社)を用いて付属のプロトコールに従い、培養上清中のIL-1 $\beta$ 量を測定した。

#### 【0074】

##### <結果>

図3に示すように、FLAG-procaspase-1発現プラスミドとNOD2-myc発現プラスミドとを共発現させた細胞において、NOD2-mycの発現量依存的に細胞内IL-1 $\beta$ 量の増加が認められた。すなわち、細胞内でのカスパーゼ1依存的なproIL-1 $\beta$ からIL-1 $\beta$ への切断が、NOD2により促進されることが判明した。

## 【0075】

図4に示すように、FLAG-procaspase-1発現プラスミドとNOD2-myc発現プラスミドとを共発現させた細胞において、NOD2-myc発現プラスミド量依存的に、細胞外へのIL-1 $\beta$ 分泌量の増加が認められた。すなわち、カスパーゼ-1依存的なIL-1 $\beta$ の細胞外への分泌が、NOD2により促進されることが判明した。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0076】

本発明は、炎症性疾患、例えば敗血症、炎症性腸疾患、クローン病およびリウマチ等の重篤なあるいは難治性の疾患の防止および／治療のために利用可能であり、医薬分野において非常に有用性が高い。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0077】

【図1-A】FLAG-procaspase-1 (C285A)発現用プラスミドのみ、NOD2-myc-His発現用プラスミドのみ、または両方を組み合わせてトランスフェクションした細胞から作製した細胞溶解液における各蛋白質の発現量を示す図である。蛋白質の検出はウェスタンブロッティング (WB) により行った。(実施例2)

【図1-B】左図は、NOD2-myc-HisとFLAG-procaspase-1 (C285A)を共発現させた細胞から作製した細胞溶解液について抗FLAG M2抗体を用いて免疫沈降 (IP) した結果、NOD2-myc-Hisのバンドが検出されたことを示す図である。右図は、上記細胞溶解液について抗myc抗体で免疫沈降した結果、NOD2-myc-HisとFLAG-procaspase-1 (C285A)を共発現させた細胞溶解液でのみ、FLAG-procaspase-1 (C285A)のバンドが検出されたことを示す図である。蛋白質の検出はウェスタンブロッティング (WB) により行った。(実施例2)

【図2-A】FLAG-procaspase-1 (C285A)発現用プラスミドおよびMyc-procaspase-1 (C285A)発現用プラスミドと図示した濃度のNOD2-myc発現用プラスミドとをトランスフェクションした細胞から作製した細胞溶解液を抗FLAG抗体で処理して得た画分において、抗myc抗体で検出されるバンドの量がNOD2-myc発現用プラスミド量依存的に増加したことを説明する図である。(実施例3)

【図2-B】FLAG-procaspase-1 (C285A)発現用プラスミドおよびMyc-procaspase-1 (C285A)発現用プラスミドと図示した濃度のNOD2-myc発現用プラスミドとをトランスフェクションした細胞から作製した細胞溶解液における各蛋白質の発現量を示す図である。(実施例3)

【図3】FLAG-procaspase-1発現プラスミドとNOD2-myc発現プラスミドとを共発現させた細胞において、NOD2-mycの発現量依存的に細胞内IL-1 $\beta$ 量の増加が認められたことを説明する図である。(実施例4)

【図4】FLAG-procaspase-1発現プラスミド (0.5 $\mu$ g) とNOD2発現プラスミドとを共発現させた細胞において、NOD2発現プラスミド量依存的に、細胞外へのIL-1 $\beta$ 分泌量が増加したことを説明する図である。図中、ベクターとは、各細胞に導入するDNA量を一定にするために加えた空ベクターを意味する。(実施例4)

## SEQUENCE LISTING

act tgg gcc tgt cag aag ctc atc gcg gct gcc caa gaa gcc cag gcc 336

Thr Trp Ala Cys Gln Lys Leu Ile Ala Ala Ala Gln Glu Ala Gln Ala	
100 105 110	
gac agc cag tcc ccc aag ctg cat ggc tgc tgg gac ccc cac tcg ctc	384
Asp Ser Gln Ser Pro Lys Leu His Gly Cys Trp Asp Pro His Ser Leu	
115 120 125	
cac cca gcc cga gac ctg cag agt cac cgg cca gcc att gtc agg agg	432
His Pro Ala Arg Asp Leu Gln Ser His Arg Pro Ala Ile Val Arg Arg	
130 135 140	
ctc cac agc cat gtg gag aac atg ctg gac ctg gca tgg gag cgg ggt	480
Leu His Ser His Val Glu Asn Met Leu Asp Leu Ala Trp Glu Arg Gly	
145 150 155 160	
ttc gtc agc cag tat gaa tgt gat gaa atc agg ttg ccg atc ttc aca	528
Phe Val Ser Gln Tyr Glu Cys Asp Glu Ile Arg Leu Pro Ile Phe Thr	
165 170 175	
ccg tcc cag agg gca aga agg ctg ctt gat ctt gcc acg gtg aaa gcg	576
Pro Ser Gln Arg Ala Arg Arg Leu Leu Asp Leu Ala Thr Val Lys Ala	
180 185 190	
aat gga ttg gct gcc ttc ctt cta caa cat gtt cag gaa tta cca gtc	624
Asn Gly Leu Ala Ala Phe Leu Leu Gln His Val Gln Glu Leu Pro Val	
195 200 205	
cca ttg gcc ctg cct ttg gaa gct gcc aca tgc aag aag tat atg gcc	672
Pro Leu Ala Leu Pro Leu Glu Ala Ala Thr Cys Lys Lys Tyr Met Ala	
210 215 220	
aag ctg agg acc acg gtg tct gct cag tct cgc ttc ctc agt acc tat	720
Lys Leu Arg Thr Thr Val Ser Ala Gln Ser Arg Phe Leu Ser Thr Tyr	
225 230 235 240	
gat gga gca gag acg ctc tgc ctg gag gac ata tac aca gag aat gtc	768
Asp Gly Ala Glu Thr Leu Cys Leu Glu Asp Ile Tyr Thr Glu Asn Val	
245 250 255	
ctg gag gtc tgg gca gat gtg ggc atg gct gga ccc ccg cag aag agc	816
Leu Glu Val Trp Ala Asp Val Gly Met Ala Gly Pro Pro Gln Lys Ser	
260 265 270	
cca gcc acc ctg ggc ctg gag gag ctc ttc agc acc cct ggc cac ctc	864
Pro Ala Thr Leu Gly Leu Glu Glu Leu Phe Ser Thr Pro Gly His Leu	
275 280 285	
aat gac gat gcg gac act gtg ctg gtg gtg ggt gag gcg ggc agt ggc	912
Asn Asp Asp Ala Asp Thr Val Leu Val Val Gly Glu Ala Gly Ser Gly	
290 295 300	

aag agc acg ctc ctg cag cgg ctg cac ttg ctg tgg gct gca ggg caa	960
Lys Ser Thr Leu Leu Gln Arg Leu His Leu Leu Trp Ala Ala Gly Gln	
305 310 315 320	
gac ttc cag gaa ttt ctc ttt gtc ttc cca ttc agc tgc cgg cag ctg	1008
Asp Phe Gln Glu Phe Leu Phe Val Phe Pro Phe Ser Cys Arg Gln Leu	
325 330 335	
cag tgc atg gcc aaa cca ctc tct gtg cgg act cta ctc ttt gag cac	1056
Gln Cys Met Ala Lys Pro Leu Ser Val Arg Thr Leu Leu Phe Glu His	
340 345 350	
tgc tgt tgg cct gat gtt ggt caa gaa gac atc ttc cag tta ctc ctt	1104
Cys Cys Trp Pro Asp Val Gly Gln Glu Asp Ile Phe Gln Leu Leu Leu	
355 360 365	
gac cac cct gac cgt gtc ctg tta acc ttt gat ggc ttt gac gag ttc	1152
Asp His Pro Asp Arg Val Leu Leu Thr Phe Asp Gly Phe Asp Glu Phe	
370 375 380	
aag ttc agg ttc acg gat cgt gaa cgc cac tgc tcc ccg acc gac ccc	1200
Lys Phe Arg Phe Thr Asp Arg Glu Arg His Cys Ser Pro Thr Asp Pro	
385 390 395 400	
acc tct gtc cag acc ctg ctc ttc aac ctt ctg cag ggc aac ctg ctg	1248
Thr Ser Val Gln Thr Leu Leu Phe Asn Leu Leu Gln Gly Asn Leu Leu	
405 410 415	
aag aat gcc cgc aag gtg gtg acc agc cgt ccg gcc gct gtg tgc gcg	1296
Lys Asn Ala Arg Lys Val Val Thr Ser Arg Pro Ala Ala Val Ser Ala	
420 425 430	
ttc ctc agg aag tac atc cgc acc gag ttc aac ctc aag ggc ttc tct	1344
Phe Leu Arg Lys Tyr Ile Arg Thr Glu Phe Asn Leu Lys Gly Phe Ser	
435 440 445	
gaa cag ggc atc gag ctg tac ctg agg aag cgc cat cat gag ccc ggg	1392
Glu Gln Gly Ile Glu Leu Tyr Leu Arg Lys Arg His His Glu Pro Gly	
450 455 460	
gtg gcg gac cgc ctc atc cgc ctg ctc caa gag acc tca gcc ctg cac	1440
Val Ala Asp Arg Leu Ile Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Ala Leu His	
465 470 475 480	
ggt ttg tgc cac ctg cct gtc ttc tca tgg atg gtg tcc aaa tgc cac	1488
Gly Leu Cys His Leu Pro Val Phe Ser Trp Met Val Ser Lys Cys His	
485 490 495	
cag gaa ctg ttg ctg cag gag ggg ggg tcc cca aag acc act aca gat	1536

Gln	Glu	Leu	Leu	Leu	Gln	Glu	Gly	Gly	Ser	Pro	Lys	Thr	Thr	Thr	Asp	
		500					505					510				
atg	tac	ctg	ctg	att	ctg	cag	cat	ttt	ctg	ctg	cat	gcc	acc	ccc	cca	1584
Met	Tyr	Leu	Leu	Ile	Leu	Gln	His	Phe	Leu	Leu	His	Ala	Thr	Pro	Pro	
		515				520					525					
gac	tca	gct	tcc	caa	ggc	ctg	gga	ccc	agt	ctt	ctt	cgg	ggc	cgc	ctc	1632
Asp	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Leu	Leu	Arg	Gly	Arg	Leu	
	530				535					540						
ccc	acc	ctc	ctg	cac	ctg	ggc	aga	ctg	gct	ctg	tgg	ggc	ctg	ggc	atg	1680
Pro	Thr	Leu	Leu	His	Leu	Gly	Arg	Leu	Ala	Leu	Trp	Gly	Leu	Gly	Met	
545				550				555							560	
tgc	tgc	tac	gtg	ttc	tca	gcc	cag	cag	ctc	cag	gca	gca	cag	gtc	agc	1728
Cys	Cys	Tyr	Val	Phe	Ser	Ala	Gln	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Gln	Val	Ser	
			565					570						575		
cct	gat	gac	att	tct	ctt	ggc	ttc	ctg	gtg	cgt	gcc	aaa	ggc	gtc	gtg	1776
Pro	Asp	Asp	Ile	Ser	Leu	Gly	Phe	Leu	Val	Arg	Ala	Lys	Gly	Val	Val	
			580				585					590				
cca	ggg	agt	acg	gcg	ccc	ctg	gaa	ttc	ctt	cac	atc	act	ttc	cag	tgc	1824
Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Leu	Glu	Phe	Leu	His	Ile	Thr	Phe	Gln	Cys	
		595				600					605					
ttc	ttt	gcc	gcg	ttc	tac	ctg	gca	ctc	agt	gct	gat	gtg	cca	cca	gct	1872
Phe	Phe	Ala	Ala	Phe	Tyr	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Asp	Val	Pro	Pro	Ala	
	610					615					620					
ttg	ctc	aga	cac	ctc	ttc	aat	tgt	ggc	agg	cca	ggc	aac	tca	cca	atg	1920
Leu	Leu	Arg	His	Leu	Phe	Asn	Cys	Gly	Arg	Pro	Gly	Asn	Ser	Pro	Met	
625				630						635					640	
gcc	agg	ctc	ctg	ccc	acg	atg	tgc	atc	cag	gcc	tcg	gag	gga	aag	gac	1968
Ala	Arg	Leu	Leu	Pro	Thr	Met	Cys	Ile	Gln	Ala	Ser	Glu	Gly	Lys	Asp	
				645				650						655		
agc	agc	gtg	gca	gct	ttg	ctg	cag	aag	gcc	gag	ccg	cac	aac	ctt	cag	2016
Ser	Ser	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	Gln	Lys	Ala	Glu	Pro	His	Asn	Leu	Gln	
			660					665					670			
atc	aca	gca	gcc	ttc	ctg	gca	ggg	ctg	ttg	tcc	cgg	gag	cac	tgg	ggc	2064
Ile	Thr	Ala	Ala	Phe	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Glu	His	Trp	Gly	
		675					680					685				
ctg	ctg	gct	gag	tgc	cag	aca	tct	gag	aag	gcc	ctg	ctc	cgg	cgc	cag	2112
Leu	Leu	Ala	Glu	Cys	Gln	Thr	Ser	Glu	Lys	Ala	Leu	Leu	Arg	Arg	Gln	
	690					695					700					

gcc tgt gcc cgc tgg tgt ctg gcc cgc agc ctc cgc aag cac ttc cac 2160  
 Ala Cys Ala Arg Trp Cys Leu Ala Arg Ser Leu Arg Lys His Phe His  
 705 710 715 720

tcc atc ccg cca gct gca ccg ggt gag gcc aag agc gtg cat gcc atg 2208  
 Ser Ile Pro Pro Ala Ala Pro Gly Glu Ala Lys Ser Val His Ala Met  
 725 730 735

ccc ggg ttc atc tgg ctc atc cgg agc ctg tac gag atg cag gag gag 2256  
 Pro Gly Phe Ile Trp Leu Ile Arg Ser Leu Tyr Glu Met Gln Glu Glu  
 740 745 750

cgg ctg gct cgg aag gct gca cgt ggc ctg aat gtt ggg cac ctc aag 2304  
 Arg Leu Ala Arg Lys Ala Ala Arg Gly Leu Asn Val Gly His Leu Lys  
 755 760 765

ttg aca ttt tgc agt gtg ggc ccc act gag tgt gct gcc ctg gcc ttt 2352  
 Leu Thr Phe Cys Ser Val Gly Pro Thr Glu Cys Ala Ala Leu Ala Phe  
 770 775 780

gtg ctg cag cac ctc cgg cgg ccc gtg gcc ctg cag ctg gac tac aac 2400  
 Val Leu Gln His Leu Arg Arg Pro Val Ala Leu Gln Leu Asp Tyr Asn  
 785 790 795 800

tct gtg ggt gac att ggc gtg gag cag ctg ctg cct tgc ctt ggt gtc 2448  
 Ser Val Gly Asp Ile Gly Val Glu Gln Leu Leu Pro Cys Leu Gly Val  
 805 810 815

tgc aag gct ctg tat ttg cgc gat aac aat atc tca gac cga ggc atc 2496  
 Cys Lys Ala Leu Tyr Leu Arg Asp Asn Asn Ile Ser Asp Arg Gly Ile  
 820 825 830

tgc aag ctc att gaa tgt gct ctt cac tgc gag caa ttg cag aag tta 2544  
 Cys Lys Leu Ile Glu Cys Ala Leu His Cys Glu Gln Leu Gln Lys Leu  
 835 840 845

gct cta ttc aac aac aaa ttg act gac ggc tgt gca cac tcc atg gct 2592  
 Ala Leu Phe Asn Asn Lys Leu Thr Asp Gly Cys Ala His Ser Met Ala  
 850 855 860

aag ctc ctt gca tgc agg cag aac ttc ttg gca ttg agg ctg ggg aat 2640  
 Lys Leu Leu Ala Cys Arg Gln Asn Phe Leu Ala Leu Arg Leu Gly Asn  
 865 870 875 880

aac tac atc act gcc gcg gga gcc caa gtg ctg gcc gag ggg ctc cga 2688  
 Asn Tyr Ile Thr Ala Ala Gly Ala Gln Val Leu Ala Glu Gly Leu Arg  
 885 890 895

ggc aac acc tcc ttg cag ttc ctg gga ttc tgg ggc aac aga gtg ggt 2736



Gly Asn Thr Ser Leu Gln Phe Leu Gly Phe Trp Gly Asn Arg Val Gly	
900 905 910	
gac gag ggg gcc cag gcc ctg gct gaa gcc ttg ggt gat cac cag agc	2784
Asp Glu Gly Ala Gln Ala Leu Ala Glu Ala Leu Gly Asp His Gln Ser	
915 920 925	
ttg agg tgg ctc agc ctg gtg ggg aac aac att ggc agt gtg ggt gcc	2832
Leu Arg Trp Leu Ser Leu Val Gly Asn Asn Ile Gly Ser Val Gly Ala	
930 935 940	
caa gcc ttg gca ctg atg ctg gca aag aac gtc atg cta gaa gaa ctc	2880
Gln Ala Leu Ala Leu Met Leu Ala Lys Asn Val Met Leu Glu Glu Leu	
945 950 955 960	
tgc ctg gag gag aac cat ctc cag gat gaa ggt gta tgt tct ctc gca	2928
Cys Leu Glu Glu Asn His Leu Gln Asp Glu Gly Val Cys Ser Leu Ala	
965 970 975	
gaa gga ctg aag aaa aat tca agt ttg aaa atc ctg aag ttg tcc aat	2976
Glu Gly Leu Lys Lys Asn Ser Ser Leu Lys Ile Leu Lys Leu Ser Asn	
980 985 990	
aac tgc atc acc tac cta ggg gca gaa gcc ctc ctg cag gcc ctt gaa	3024
Asn Cys Ile Thr Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Leu Leu Gln Ala Leu Glu	
995 1000 1005	
agg aat gac acc atc ctg gaa gtc tgg ctc cga ggg aac act ttc	3069
Arg Asn Asp Thr Ile Leu Glu Val Trp Leu Arg Gly Asn Thr Phe	
1010 1015 1020	
tct cta gag gag gtt gac aag ctc ggc tgc agg gac acc aga ctc	3114
Ser Leu Glu Glu Val Asp Lys Leu Gly Cys Arg Asp Thr Arg Leu	
1025 1030 1035	
ttg ctt	3120
Leu Leu	
1040	

<210> 2  
 <211> 1040  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Glu Glu Gly Gly Ser Ala Ser His Asp Glu Glu Glu Arg Ala
1 5 10 15

Ser Val Leu Leu Gly His Ser Pro Gly Cys Glu Met Cys Ser Gln Glu  
20 25 30

Ala Phe Gln Ala Gln Arg Ser Gln Leu Val Glu Leu Leu Val Ser Gly  
35 40 45

Ser Leu Glu Gly Phe Glu Ser Val Leu Asp Trp Leu Leu Ser Trp Glu  
50 55 60

Val Leu Ser Trp Glu Asp Tyr Glu Gly Phe His Leu Leu Gly Gln Pro  
65 70 75 80

Leu Ser His Leu Ala Arg Arg Leu Leu Asp Thr Val Trp Asn Lys Gly  
85 90 95

Thr Trp Ala Cys Gln Lys Leu Ile Ala Ala Ala Gln Glu Ala Gln Ala  
100 105 110

Asp Ser Gln Ser Pro Lys Leu His Gly Cys Trp Asp Pro His Ser Leu  
115 120 125

His Pro Ala Arg Asp Leu Gln Ser His Arg Pro Ala Ile Val Arg Arg  
130 135 140

Leu His Ser His Val Glu Asn Met Leu Asp Leu Ala Trp Glu Arg Gly  
145 150 155 160

Phe Val Ser Gln Tyr Glu Cys Asp Glu Ile Arg Leu Pro Ile Phe Thr  
165 170 175

Pro Ser Gln Arg Ala Arg Arg Leu Leu Asp Leu Ala Thr Val Lys Ala  
180 185 190

Asn Gly Leu Ala Ala Phe Leu Leu Gln His Val Gln Glu Leu Pro Val  
195 200 205

Pro Leu Ala Leu Pro Leu Glu Ala Ala Thr Cys Lys Lys Tyr Met Ala

210

215

220

Lys Leu Arg Thr Thr Val Ser Ala Gln Ser Arg Phe Leu Ser Thr Tyr  
225 230 235 240

Asp Gly Ala Glu Thr Leu Cys Leu Glu Asp Ile Tyr Thr Glu Asn Val  
245 250 255

Leu Glu Val Trp Ala Asp Val Gly Met Ala Gly Pro Pro Gln Lys Ser  
260 265 270

Pro Ala Thr Leu Gly Leu Glu Glu Leu Phe Ser Thr Pro Gly His Leu  
275 280 285

Asn Asp Asp Ala Asp Thr Val Leu Val Val Gly Glu Ala Gly Ser Gly  
290 295 300

Lys Ser Thr Leu Leu Gln Arg Leu His Leu Leu Trp Ala Ala Gly Gln  
305 310 315 320

Asp Phe Gln Glu Phe Leu Phe Val Phe Pro Phe Ser Cys Arg Gln Leu  
325 330 335

Gln Cys Met Ala Lys Pro Leu Ser Val Arg Thr Leu Leu Phe Glu His  
340 345 350

Cys Cys Trp Pro Asp Val Gly Gln Glu Asp Ile Phe Gln Leu Leu Leu  
355 360 365

Asp His Pro Asp Arg Val Leu Leu Thr Phe Asp Gly Phe Asp Glu Phe  
370 375 380

Lys Phe Arg Phe Thr Asp Arg Glu Arg His Cys Ser Pro Thr Asp Pro  
385 390 395 400

Thr Ser Val Gln Thr Leu Leu Phe Asn Leu Leu Gln Gly Asn Leu Leu  
405 410 415

Lys Asn Ala Arg Lys Val Val Thr Ser Arg Pro Ala Ala Val Ser Ala  
420 425 430

Phe Leu Arg Lys Tyr Ile Arg Thr Glu Phe Asn Leu Lys Gly Phe Ser  
435 440 445

Glu Gln Gly Ile Glu Leu Tyr Leu Arg Lys Arg His His Glu Pro Gly  
450 455 460

Val Ala Asp Arg Leu Ile Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Ala Leu His  
465 470 475 480

Gly Leu Cys His Leu Pro Val Phe Ser Trp Met Val Ser Lys Cys His  
485 490 495

Gln Glu Leu Leu Leu Gln Glu Gly Gly Ser Pro Lys Thr Thr Thr Asp  
500 505 510

Met Tyr Leu Leu Ile Leu Gln His Phe Leu Leu His Ala Thr Pro Pro  
515 520 525

Asp Ser Ala Ser Gln Gly Leu Gly Pro Ser Leu Leu Arg Gly Arg Leu  
530 535 540

Pro Thr Leu Leu His Leu Gly Arg Leu Ala Leu Trp Gly Leu Gly Met  
545 550 555 560

Cys Cys Tyr Val Phe Ser Ala Gln Gln Leu Gln Ala Ala Gln Val Ser  
565 570 575

Pro Asp Asp Ile Ser Leu Gly Phe Leu Val Arg Ala Lys Gly Val Val  
580 585 590

Pro Gly Ser Thr Ala Pro Leu Glu Phe Leu His Ile Thr Phe Gln Cys  
595 600 605

Phe Phe Ala Ala Phe Tyr Leu Ala Leu Ser Ala Asp Val Pro Pro Ala

610

615

620

Leu Leu Arg His Leu Phe Asn Cys Gly Arg Pro Gly Asn Ser Pro Met  
625 630 635 640

Ala Arg Leu Leu Pro Thr Met Cys Ile Gln Ala Ser Glu Gly Lys Asp  
645 650 655

Ser Ser Val Ala Ala Leu Leu Gln Lys Ala Glu Pro His Asn Leu Gln  
660 665 670

Ile Thr Ala Ala Phe Leu Ala Gly Leu Leu Ser Arg Glu His Trp Gly  
675 680 685

Leu Leu Ala Glu Cys Gln Thr Ser Glu Lys Ala Leu Leu Arg Arg Gln  
690 695 700

Ala Cys Ala Arg Trp Cys Leu Ala Arg Ser Leu Arg Lys His Phe His  
705 710 715 720

Ser Ile Pro Pro Ala Ala Pro Gly Glu Ala Lys Ser Val His Ala Met  
725 730 735

Pro Gly Phe Ile Trp Leu Ile Arg Ser Leu Tyr Glu Met Gln Glu Glu  
740 745 750

Arg Leu Ala Arg Lys Ala Ala Arg Gly Leu Asn Val Gly His Leu Lys  
755 760 765

Leu Thr Phe Cys Ser Val Gly Pro Thr Glu Cys Ala Ala Leu Ala Phe  
770 775 780

Val Leu Gln His Leu Arg Arg Pro Val Ala Leu Gln Leu Asp Tyr Asn  
785 790 795 800

Ser Val Gly Asp Ile Gly Val Glu Gln Leu Leu Pro Cys Leu Gly Val  
805 810 815

Cys Lys Ala Leu Tyr Leu Arg Asp Asn Asn Ile Ser Asp Arg Gly Ile  
820 825 830

Cys Lys Leu Ile Glu Cys Ala Leu His Cys Glu Gln Leu Gln Lys Leu  
835 840 845

Ala Leu Phe Asn Asn Lys Leu Thr Asp Gly Cys Ala His Ser Met Ala  
850 855 860

Lys Leu Leu Ala Cys Arg Gln Asn Phe Leu Ala Leu Arg Leu Gly Asn  
865 870 875 880

Asn Tyr Ile Thr Ala Ala Gly Ala Gln Val Leu Ala Glu Gly Leu Arg  
885 890 895

Gly Asn Thr Ser Leu Gln Phe Leu Gly Phe Trp Gly Asn Arg Val Gly  
900 905 910

Asp Glu Gly Ala Gln Ala Leu Ala Glu Ala Leu Gly Asp His Gln Ser  
915 920 925

Leu Arg Trp Leu Ser Leu Val Gly Asn Asn Ile Gly Ser Val Gly Ala  
930 935 940

Gln Ala Leu Ala Leu Met Leu Ala Lys Asn Val Met Leu Glu Glu Leu  
945 950 955 960

Cys Leu Glu Glu Asn His Leu Gln Asp Glu Gly Val Cys Ser Leu Ala  
965 970 975

Glu Gly Leu Lys Lys Asn Ser Ser Leu Lys Ile Leu Lys Leu Ser Asn  
980 985 990

Asn Cys Ile Thr Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Leu Leu Gln Ala Leu Glu  
995 1000 1005

Arg Asn Asp Thr Ile Leu Glu Val Trp Leu Arg Gly Asn Thr Phe

1010

1015

1020

Ser Leu Glu Glu Val Asp Lys Leu Gly Cys Arg Asp Thr Arg Leu  
1025 1030 1035

Leu Leu  
1040

<210> 3  
<211> 1212  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1212)  
<223>

<400> 3  
atg gcc gac aag gtc ctg aag gag aag aga aag ctg ttt atc cgt tcc 48  
Met Ala Asp Lys Val Leu Lys Glu Lys Arg Lys Leu Phe Ile Arg Ser  
1 5 10 15

atg ggt gaa ggt aca ata aat ggc tta ctg gat gaa tta tta cag aca 96  
Met Gly Glu Gly Thr Ile Asn Gly Leu Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr  
20 25 30

agg gtg ctg aac aag gaa gag atg gag aaa gta aaa cgt gaa aat gct 144  
Arg Val Leu Asn Lys Glu Glu Met Glu Lys Val Lys Arg Glu Asn Ala  
35 40 45

aca gtt atg gat aag acc cga gct ttg att gac tcc gtt att ccg aaa 192  
Thr Val Met Asp Lys Thr Arg Ala Leu Ile Asp Ser Val Ile Pro Lys  
50 55 60

ggg gca cag gca tgc caa att tgc atc aca tac att tgt gaa gaa gac 240  
Gly Ala Gln Ala Cys Gln Ile Cys Ile Thr Tyr Ile Cys Glu Glu Asp  
65 70 75 80

agt tac ctg gca ggg acg ctg gga ctc tca gca gat caa aca tct gga 288  
Ser Tyr Leu Ala Gly Thr Leu Gly Leu Ser Ala Asp Gln Thr Ser Gly  
85 90 95

aat tac ctt aat atg caa gac tct caa gga gta ctt tct tcc ttt cca 336  
Asn Tyr Leu Asn Met Gln Asp Ser Gln Gly Val Leu Ser Ser Phe Pro  
100 105 110

gct cct cag gca gtg cag gac aac cca gct atg ccc aca tcc tca ggc Ala Pro Gln Ala Val Gln Asp Asn Pro Ala Met Pro Thr Ser Ser Gly 115 120 125	384
tca gaa ggg aat gtc aag ctt tgc tcc cta gaa gaa gct caa agg ata Ser Glu Gly Asn Val Lys Leu Cys Ser Leu Glu Glu Ala Gln Arg Ile 130 135 140	432
tgg aaa caa aag tcg gca gag att tat cca ata atg gac aag tca agc Trp Lys Gln Lys Ser Ala Glu Ile Tyr Pro Ile Met Asp Lys Ser Ser 145 150 155 160	480
cgc aca cgt ctt gct ctc att atc tgc aat gaa gaa ttt gac agt att Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Glu Glu Phe Asp Ser Ile 165 170 175	528
cct aga aga act gga gct gag gtt gac atc aca ggc atg aca atg ctg Pro Arg Arg Thr Gly Ala Glu Val Asp Ile Thr Gly Met Thr Met Leu 180 185 190	576
cta caa aat ctg ggg tac agc gta gat gtg aaa aaa aat ctc act gct Leu Gln Asn Leu Gly Tyr Ser Val Asp Val Lys Lys Asn Leu Thr Ala 195 200 205	624
tcg gac atg act aca gag ctg gag gca ttt gca cac cgc cca gag cac Ser Asp Met Thr Thr Glu Leu Glu Ala Phe Ala His Arg Pro Glu His 210 215 220	672
aag acc tct gac agc acg ttc ctg gtg ttc atg tct cat ggt att cgg Lys Thr Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Phe Met Ser His Gly Ile Arg 225 230 235 240	720
gaa ggc att tgt ggg aag aaa cac tct gag caa gtc cca gat ata cta Glu Gly Ile Cys Gly Lys Lys His Ser Glu Gln Val Pro Asp Ile Leu 245 250 255	768
caa ctc aat gca atc ttt aac atg ttg aat acc aag aac tgc cca agt Gln Leu Asn Ala Ile Phe Asn Met Leu Asn Thr Lys Asn Cys Pro Ser 260 265 270	816
ttg aag gac aaa ccg aag gtg atc atc atc cag gcc tgc cgt ggt gac Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Ile Gln Ala Cys Arg Gly Asp 275 280 285	864
agc cct ggt gtg gtg tgg ttt aaa gat tca gta gga gtt tct gga aac Ser Pro Gly Val Val Trp Phe Lys Asp Ser Val Gly Val Ser Gly Asn 290 295 300	912
cta tct tta cca act aca gaa gag ttt gag gat gat gct att aag aaa Leu Ser Leu Pro Thr Thr Glu Glu Phe Glu Asp Asp Ala Ile Lys Lys	960



305                      310                      315                      320  
 gcc cac ata gag aag gat ttt atc gct ttc tgc tct tcc aca cca gat      1008  
 Ala His Ile Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys Ser Ser Thr Pro Asp  
                                  325                      330                      335  
 aat gtt tct tgg aga cat ccc aca atg ggc tct gtt ttt att gga aga      1056  
 Asn Val Ser Trp Arg His Pro Thr Met Gly Ser Val Phe Ile Gly Arg  
                                  340                      345                      350  
 ctc att gaa cat atg caa gaa tat gcc tgt tcc tgt gat gtg gag gaa      1104  
 Leu Ile Glu His Met Gln Glu Tyr Ala Cys Ser Cys Asp Val Glu Glu  
                                  355                      360                      365  
 att ttc cgc aag gtt cga ttt tca ttt gag cag cca gat ggt aga gcg      1152  
 Ile Phe Arg Lys Val Arg Phe Ser Phe Glu Gln Pro Asp Gly Arg Ala  
                                  370                      375                      380  
 cag atg ccc acc act gaa aga gtg act ttg aca aga tgt ttc tac ctc      1200  
 Gln Met Pro Thr Thr Glu Arg Val Thr Leu Thr Arg Cys Phe Tyr Leu  
 385                      390                      395                      400  
 ttc cca gga cat                      1212  
 Phe Pro Gly His

<210> 4  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Asp Lys Val Leu Lys Glu Lys Arg Lys Leu Phe Ile Arg Ser  
 1                      5                      10                      15

Met Gly Glu Gly Thr Ile Asn Gly Leu Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr  
                                  20                      25                      30

Arg Val Leu Asn Lys Glu Glu Met Glu Lys Val Lys Arg Glu Asn Ala  
                                  35                      40                      45

Thr Val Met Asp Lys Thr Arg Ala Leu Ile Asp Ser Val Ile Pro Lys  
 50                      55                      60

Gly Ala Gln Ala Cys Gln Ile Cys Ile Thr Tyr Ile Cys Glu Glu Asp  
65 70 75 80

Ser Tyr Leu Ala Gly Thr Leu Gly Leu Ser Ala Asp Gln Thr Ser Gly  
85 90 95

Asn Tyr Leu Asn Met Gln Asp Ser Gln Gly Val Leu Ser Ser Phe Pro  
100 105 110

Ala Pro Gln Ala Val Gln Asp Asn Pro Ala Met Pro Thr Ser Ser Gly  
115 120 125

Ser Glu Gly Asn Val Lys Leu Cys Ser Leu Glu Glu Ala Gln Arg Ile  
130 135 140

Trp Lys Gln Lys Ser Ala Glu Ile Tyr Pro Ile Met Asp Lys Ser Ser  
145 150 155 160

Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Glu Glu Phe Asp Ser Ile  
165 170 175

Pro Arg Arg Thr Gly Ala Glu Val Asp Ile Thr Gly Met Thr Met Leu  
180 185 190

Leu Gln Asn Leu Gly Tyr Ser Val Asp Val Lys Lys Asn Leu Thr Ala  
195 200 205

Ser Asp Met Thr Thr Glu Leu Glu Ala Phe Ala His Arg Pro Glu His  
210 215 220

Lys Thr Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Phe Met Ser His Gly Ile Arg  
225 230 235 240

Glu Gly Ile Cys Gly Lys Lys His Ser Glu Gln Val Pro Asp Ile Leu  
245 250 255

Gln Leu Asn Ala Ile Phe Asn Met Leu Asn Thr Lys Asn Cys Pro Ser  
260 265 270

Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Ile Gln Ala Cys Arg Gly Asp  
275 280 285

Ser Pro Gly Val Val Trp Phe Lys Asp Ser Val Gly Val Ser Gly Asn  
290 295 300

Leu Ser Leu Pro Thr Thr Glu Glu Phe Glu Asp Asp Ala Ile Lys Lys  
305 310 315 320

Ala His Ile Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys Ser Ser Thr Pro Asp  
325 330 335

Asn Val Ser Trp Arg His Pro Thr Met Gly Ser Val Phe Ile Gly Arg  
340 345 350

Leu Ile Glu His Met Gln Glu Tyr Ala Cys Ser Cys Asp Val Glu Glu  
355 360 365

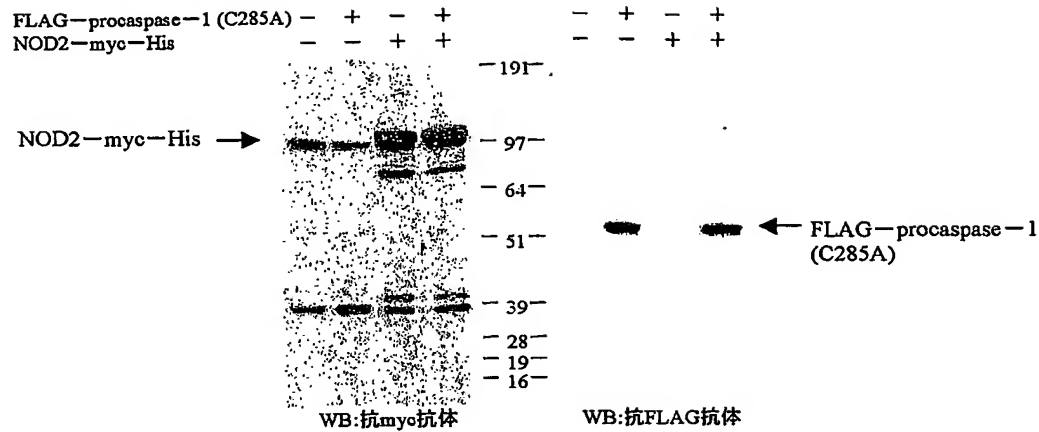
Ile Phe Arg Lys Val Arg Phe Ser Phe Glu Gln Pro Asp Gly Arg Ala  
370 375 380

Gln Met Pro Thr Thr Glu Arg Val Thr Leu Thr Arg Cys Phe Tyr Leu  
385 390 395 400

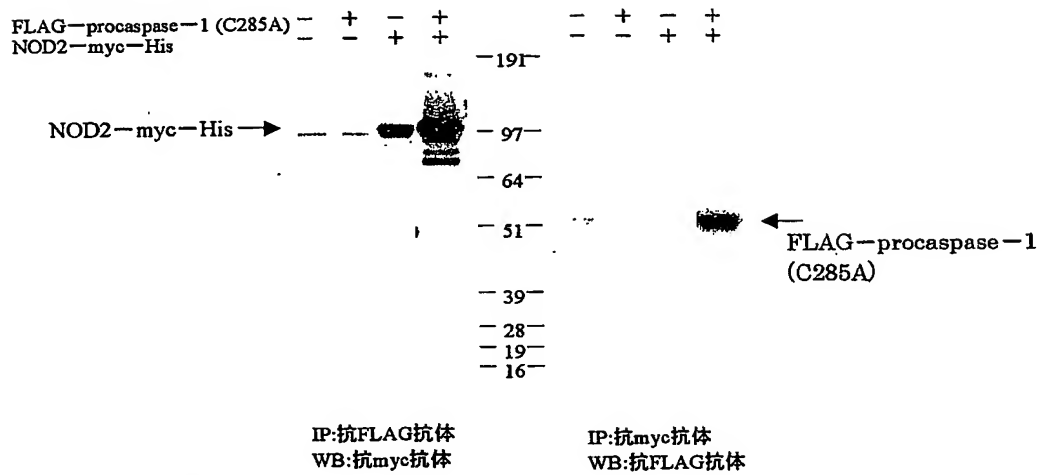
Phe Pro Gly His

【書類名】図面

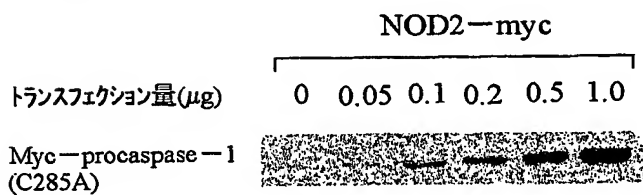
【図 1 - A】



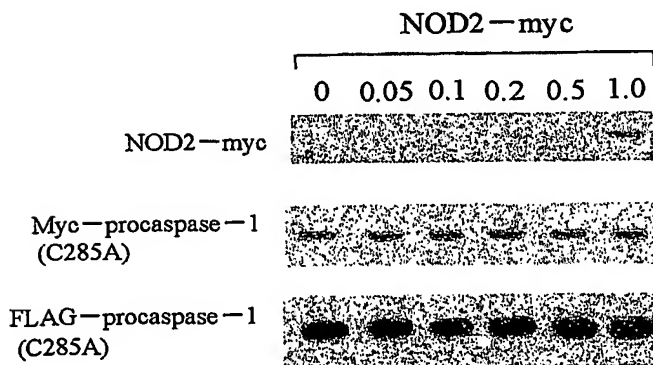
【図 1 - B】



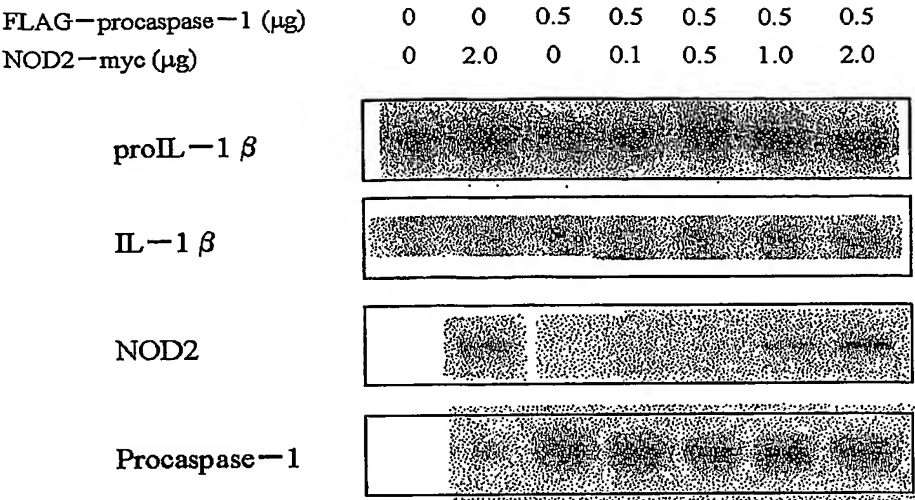
【図 2 - A】



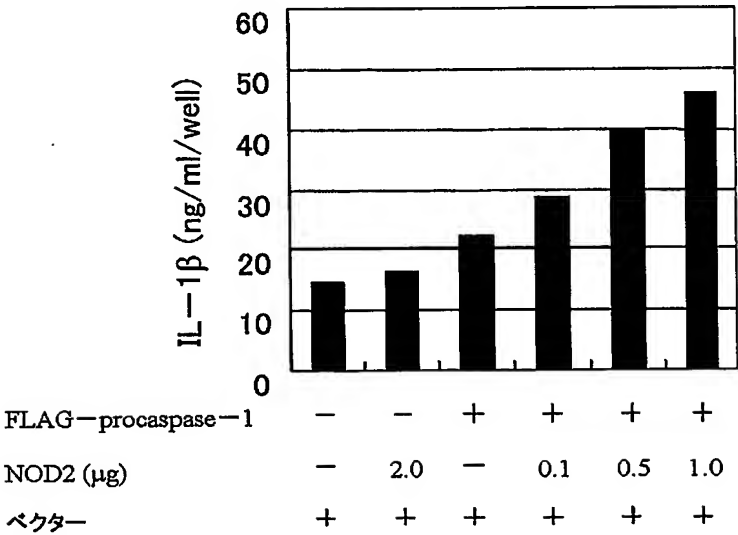
【図 2 - B】



【図 3】



【図 4】



## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 プロカスパーゼ 1 と結合してこれの多量体化を促進し、これを活性化する新たな蛋白質を見出し、該蛋白質とプロカスパーゼ 1 の結合を阻害することにより、プロカスパーゼ 1 の多量体化阻害、プロカスパーゼ 1 の活性化阻害およびカスパーゼ 1 の生成阻害、ひいては炎症性疾患の防止および／または治療を可能にする手段を提供すること。

【解決手段】 NOD 2 とプロカスパーゼ 1 の結合を阻害することを特徴とする、プロカスパーゼ 1 の多量体化の阻害方法および阻害剤、プロカスパーゼ 1 の活性化の阻害方法および阻害剤、カスパーゼ 1 の生成の阻害方法および阻害剤、炎症性疾患の防止方法および／または治療方法、炎症性疾患の防止剤および／または治療剤、NOD 2 とプロカスパーゼ 1 の結合を阻害する化合物の同定方法、並びに該同定方法に用いる試薬キット。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-396278
受付番号	50301948259
書類名	特許願
担当官	植田 晴穂 6992
作成日	平成15年11月27日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年11月26日

特願 2003-396278

出願人履歴情報

識別番号 [000002831]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

氏 名 第一製薬株式会社



特願 2 0 0 3 - 3 9 6 2 7 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 0 5 2 0 6 2 8 ]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 1 0 月 2 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地 幕張テクノガーデンD  
1 7

氏 名

セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017586

International filing date: 26 November 2004 (26.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-396278  
Filing date: 26 November 2003 (26.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**